

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 620 702**

21 Número de solicitud: 201700440

51 Int. Cl.:

**C12N 15/63** (2006.01)

**C12N 15/79** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**29.03.2017**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**29.06.2017**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE CANTABRIA (100.0%)**  
**Pabellón de Gobierno, Avda. de los Castros s/n**  
**39005 Santander (Cantabria) ES**

72 Inventor/es:

**VILLAR RAMOS, Ana Victoria**

54 Título: **Construcción génica y su empleo en el tratamiento de la fibrosis cardíaca**

57 Resumen:

Construcción génica y su empleo en el tratamiento de la fibrosis cardíaca.

La presente invención se refiere a una nueva construcción génica que comprende a) una secuencia de ADN que codifica para la proteína proMMP2, b) una secuencia de ADN que codifica para el promotor de MHC-{be}, operativamente unida a la secuencia a), y c) un vector de expresión y secreción de proteínas que une operativamente a las secuencias a) y b). Asimismo, se contempla una composición farmacéutica, que comprende dicha construcción génica, para su empleo en el tratamiento de la fibrosis cardíaca. Finalmente se contempla el método para la obtención de la construcción génica de la invención.

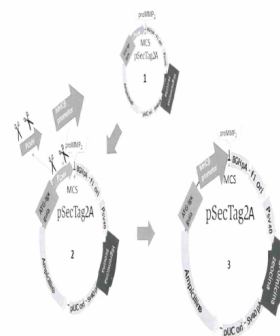


FIGURA 1

## DESCRIPCIÓN

Construcción génica y su empleo en el tratamiento de la fibrosis cardíaca.

### 5 Objeto de la invención

La presente invención está enmarcada dentro del campo del ADN molecular, en concreto, aplicado a la Biomedicina Cardíaca. En particular se contempla un sistema de alerta genético que permite el control de la expresión y secreción de la proteína MMP2 de forma  
10 específica en pacientes con fibrosis cardíaca, sin activarse en corazones sanos.

### Antecedentes de la invención

Las metaloproteinasas de la matriz (MMPs) desempeñan papeles fisiopatológicos cruciales en la remodelación maladaptativa del corazón en respuesta al crecimiento hipertrófico de los cardiomiocitos y la fibrosis intersticial. Constituyen una familia de más de 20 enzimas dependientes del zinc que colectivamente tienen la capacidad de degradar todos los componentes de la matriz extracelular. La mayoría de las MMPs conocidas son segregadas al espacio extracelular y están estrictamente reguladas en tres niveles:  
20 transcripción, activación de pro-enzimas latentes y por sus inhibidores tisulares naturales de metaloproteinasas (TIMPs) (Nagase, H. and J. F. Woessner, Jr. "Matrix metalloproteinases". (1999) *J Biol Chem* 274(31): 21491-21494). Las MMPs desempeñan sin duda un papel importante en el mantenimiento de la arquitectura y la función cardíaca normales. La expresión de MMPs en diferentes tipos celulares como cardiomiocitos, células endoteliales, células de músculo liso vascular y fibroblastos, se asocia con la  
25 progresión a estados patológicos.

La metaloproteinasa de matriz-2 (MMP2) pertenece al grupo de gelatinasas y presenta un dominio, insertado en el dominio catalítico, que se une a gelatina, colágenos y laminina. La MMP2 digiere los colágenos tipo I, II y III (Aimes, R. T. and J. P. Quigley (1995). "*Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4-and 1/4-length fragments*" *J Biol Chem* 270(11): 5872-5876). En modelos de ratón a los que se les somete a sobrecarga de presión, la ausencia de MMP2 promueve una mayor hipertrofia y fibrosis cardíaca que en ratones salvajes (Wang, X., E. Berry, et al. (2015). "*Matrix metalloproteinase-2 mediates a mechanism of metabolic cardioprotection consisting of negative regulation of the sterol regulatory element-binding protein-2/3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase pathway in the heart*". *Hypertension* 65(4): 882-888). Este sistema de protección falla en pacientes con disfunción cardíaca mantenida durante años (Heymans, S, B. Schroen, et al. (2005). "*Increased cardiac expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 is related to cardiac fibrosis and dysfunction in the chronic pressure-overloaded human heart*". *Circulation* 112(8): 1136-1144).  
40

El inhibidor natural de MMP2 (TIMP-2) desempeña un papel fundamental y diferencial en la mediación del remodelado patológico cardíaco, independientemente de su función inhibidora de MMP. Por ello, no es una buena opción inhibir TIMP2 para controlar MMP2 por el desequilibrio generado en las células cardíacas que a largo plazo va en detrimento de la función cardíaca (Fan, D., A Takawale, et al. (2014). "*Differential role of TIMP2 and TIMP3 in cardiac hypertrophy, fibrosis, and diastolic dysfunction*". *Cardiovasc Res* 103(2): 268-280). Por ello, una sobreexpresión de MMP2 en el lugar correcto y en el momento adecuado sería una buena protección para la función cardíaca.  
50

Multitud de estudios publicados mantienen que la MMP2 es una proteína que elimina la fibrosis de muchos tejidos como puede ser el corazón (por ejemplo, *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008 Oct; 295(4): H1394-402. doi: 10.1152/ajpheart.00346.2008), pero al administrar MMP2, bien sea *in vitro* o *in vivo*, no existe ningún control de su actividad, es decir no se puede controlar cuando comienza a eliminar fibrosis y cuando finaliza, ni tampoco si lo hace indiscriminadamente sobre cualquier tejido al introducirlo en un organismo. Se han probado diferentes tipos de herramientas para llevar MMP2 a los órganos destino como el corazón (SBC2011-53761, pp. 199-200; 2 doi: 10.1115/SBC2011-53761. *Adv Mater.* 2015 Oct 7; 27(37): 5547-52 doi: 10.1002/adma.201502003) con el objetivo de eliminar la fibrosis dañina que puede llevar a la muerte del paciente. Cobra especial importancia la regulación de MMP2 por su tremenda importancia en la eliminación de la fibrosis cardíaca, para que actúe sólo y exclusivamente en el órgano diana cuando esté dañado (*IUBMB Life*, 64(2): 143-150, February 2012 JSSN 1521-6543 print/ISSN 1521-6551 online DOI: 10.1002/iub.594).

Por otra parte, la miosina de cadena pesada  $\beta$  (MHC $\beta$ ) es un marcador específico de hipertrofia patológica. La MHC es el motor molecular que impulsa la contracción muscular. El músculo cardíaco expresa dos isoformas de miosina de cadena pesada (MHC) designadas como  $\alpha$  (ATPasa altamente activa) y  $\beta$  (de baja actividad ATPasa). La isoforma  $\beta$  no es tan eficaz como la isoforma  $\alpha$  en las funciones contráctiles en el adulto y su composición fenotípica regula las propiedades intrínsecas de contracción del corazón (Lompre, A. M. B. Nadai-Ginard, et al. (1984). "Expression of the cardiac ventricular alpha-and  $\beta$ -myosin heavy chain genes is developmentally and hormonally regulated". *J Biol Chem* 259(10): 6437-6446). La expresión de la isoforma cardíaca MHC ( $\alpha$  o  $\beta$ ) está regulada en el desarrollo. Durante el primer período de la vida postnatal de los roedores hay un cambio completo de una expresión predominante de MHC $\beta$  al nacer (isoforma fetal). a una expresión predominante de MHC $\alpha$  (isoforma del adulto). A lo largo de la vida adulta, la expresión de MHC $\alpha$  predomina en un corazón normal. La expresión de MHC $\beta$  aumenta gradualmente a medida que el animal crece (Lompre, Nadai-Ginard et al., 1984). El nivel de expresión de MHC $\beta$  puede cambiar totalmente en cualquier dirección en ciertos estados fisiopatológicos. Así, por ejemplo, el gen MHC $\beta$  se induce junto con otros genes "fetales" durante la hipertrofia patológica cardíaca (Morkin, E. "Control of cardiac myosin heavy chain gene expression". (2000) *Microsc Res Tech* 50(6): 522-531). Este cambio de isoforma no se detecta en la hipertrofia desarrollada con entrenamiento deportivo, por lo que la hipertrofia fisiológica no aumenta la concentración de MHC $\beta$  (Scheuer, J., A Malhotra, et al. (1982). "Physiologic cardiac hypertrophy corrects contractile protein abnormalities associated with pathologic hypertrophy in rats". *J Clin Invest* 70(6): 1300-1305; Frey, N., H. A. Katus, et al. (2004). "Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target?" *Circulation* 109(13): 1580-1589). Sin embargo, en pacientes con estenosis aórtica, el MHC $\beta$  y el índice de masa corporal constituyen predictores negativos de la normalización de la masa ventricular izquierda tras el reemplazo valvular (Villar, A. V., D. Merino, et al. (2011). "Myocardial gene expression of microRNA-133a and myosin heavy and light chains, in conjunction with clinical parameters, predict regression of left ventricular hypertrophy after valve replacement in patients with aortic stenosis". *Heart* 97(14): 1132-1137).

También en ratones añosos sometidos a constricción aórtica transversal (imitando estenosis aórtica en pacientes) se produce la sobreexpresión miocárdica de genes relacionados con el remodelado como MHC $\beta$  y se observa una reducción en MHC $\alpha$  (Montalva, C., A. V. Villar, et al. (2012). "Androgens contribute to sex differences in myocardial remodeling under pressure overload by a mechanism involving TGF- $\beta$ ". *PLoS One* 7(4): 25). Por otra parte, en roedores adultos que presentaron insuficiencia cardíaca grave se produce un notable aumento en la isoforma  $\beta$  de MHC, lo que lo convierte en un marcador selectivo de esta patología (Qi, Y, Q Zhu, et al. (2015). "Activation of Foxo1 by

*insulin resistance promotes cardiac dysfunction and  $\beta$ -myosin heavy chain gene expression". Gire Heart Fail 8(1): 198-208)*

La expresión de la proteína MHC $\beta$  es, por tanto, específica de corazón (células cardiomiocitarias y del sistema cardiovascular), expresándose también en bajas concentraciones en músculo esquelético pulmón y glándula mamaria no lactante, y tejido adiposo marrón, en ratón (<http://biogps.org/#goto=genereport&id=140781>) y en corazón y musculo esquelético, en humanos (<http://biogps.org/#goto=genereport&id=140781>).

Los autores de la presente invención, en base a las necesidades que existen en el estado de la técnica en relación con una protección adecuada de la función cardiaca, han desarrollado, tras un importante trabajo de Investigación, un sistema que permite la sobreexpresión de la proteína MMP2 en el lugar correcto y en el momento adecuado, que han denominado "sistema de alerta fibrogenético".

El sistema se basa en una construcción génica novedosa, formada por dos insertos de ADN, uno correspondiente a la metaloproteinasas de matriz-2 (MMP2) y otro al promotor de miosina de cadena pesada  $\beta$  (MHC $\beta$ ) Incluidos en un vector de expresión y secreción adecuado (pSecTag2A). Nunca antes se había conseguido ensamblar estos tres componentes y que funcionaran juntos.

El sistema desarrollado por los autores de la presente invención permite el desarrollo de composiciones farmacológicas que controlan la expresión de MMP2 de forma que se activa en la célula sólo en caso de necesidad, cuando ésta detecta el inicio del remodelado patológico. El remodelado patológico consta de los fenómenos de hipertrofia y fibrosis. La composición farmacológica que degrada la fibrosis comienza a actuar sólo en el caso de que el fenómeno de hipertrofia se inicie. Es decir, no es un fármaco convencional cuyo funcionamiento comienza cuando se administra Esta composición es inocua porque es selectiva de la enfermedad y se puede administrar tanto a corazones sanos como no sanos, ya que se activa exclusivamente en corazones no sanos. Otro avance novedoso de esta terapia génica es la ausencia de efectos secundarios en el resto de tejidos del organismo, puesto que la activación del fármaco se da en sistema cardiovascular exclusivamente cuando se produce un aumento de la expresión de MHC $\beta$ , situación que sólo se da en los casos de corazones patológicos.

### Descripción de las figuras

Figura 1.- Esquema del procedimiento de obtención del sistema de alerta fibrogenético (1).- Incorporación del inserto proMMP2 al sitio de clonación múltiple (MCS) del vector pSecTag2A comercial para la obtención del primer clan (proMMP2-pSecTag2A). (2).- Deleción del promotor de CMV del vector pSecTag2A. 3.- Inserción del promotor de MHC $\beta$  en el sitio del promotor CMV (PCMV) dando lugar al segundo clan (promotor MHC $\beta$ -pSecTag2A-proMMP2).

Figura 2.- Gráficos que muestran el incremento de la expresión extracelular de la proteína MMP2 al aumentar la expresión génica de MHC $\beta$  en la línea celular NIH-3T3, añadiendo 0.3 ng/ml de TGF $\beta$  recombinante. **A:** Western Blot representativo de la expresión en el medio extracelular de MMP2 marcado en el e-terminal con el etítopo c-myc para su detección con el anticuerpo anti-c-myc y su diferenciación de la MMP2 endógena, con su control de carga proteico gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). **B:** Densitograma que muestra la cuantificación de la media de 3 western blots medido en unidades arbitrarias de densidad óptica. **C:** Expresión génica mediante q-PCR de MHC $\beta$  antes y después de la adición de TGF $\beta$  recombinante (y con ello de la activación de la síntesis de MHC $\beta$ ) en fibroblastos NIH-3T3,  $p < 0,001^{***}$  T de student.



Figura 3.-Incremento de la actividad enzimática de MMP2 como gelatinasa en células transfectadas con el "sistema de alerta fibrogenético" donde se activa la expresión de MHC $\beta$  con TGF $\beta$  recombinante (0,3 ng/ml). **A.** Imagen de la degradación del sustrato gelatina al ponerlo en contacto con el medio extracelular de células 3T3 que contienen el "sistema de alerta fibrogenético" (clon promotor de MHC $\beta$ -pSecTag2A-proMMP2) y su control de carga (proteína inespecífica en tinción de coomassie blue). **B.** Densitograma que indica el aumento significativo de la degradación de gelatina al añadir TGF $\beta$  al medio celular,  $p < 0,05$ \* T de student.

## Descripción de la invención

En base a las necesidades en el estado de la técnica de nuevas herramientas que permitan el empleo controlado y específico de la proteína MMP2 en la eliminación de la fibrosis cardíaca, los autores de la presente invención han desarrollado una construcción de ADN molecular que denominan "sistema de alerta fibrogenético" que permite regular la expresión de esta proteína para que actúe sólo y exclusivamente en el órgano diana y únicamente cuando esté dañado.

El sistema de alerta fibrogenético se basa en una nueva construcción de ADN molecular formada por dos insertos de ADN, uno correspondiente al gen que codifica para el precursor de la proteína metaloproteínasa de matriz-2 (proMMP2) y otro al promotor de la miosina de cadena pesada  $\beta$  (MHC $\beta$ ), incluidos en un vector de expresión y secreción adecuado.

Esta nueva construcción de ADN molecular permite sintetizar en el interior de una célula la forma latente de la proteína MMP2 y secretar MMP2 activa al medio extracelular.

El sistema así diseñado se activa cuando las células del tejido diana detectan daño cardíaco y responden con mecanismos iniciales de defensa (mediante la expresión específica de MHC $\beta$  en corazón).

Una vez activado, el sistema de alerta fibrogenético expresa y secreta la proteína MMP2 activa para proceder a la degradación de la fibrosis cardíaca.

Así, en un primer aspecto principal de la invención, se contempla una construcción de ADN molecular (de aquí en adelante, construcción génica de la invención), que comprende:

- a. Una secuencia de ADN que codifica para el precursor de la proteína MMP2 (proMMP2),
- b. Una secuencia de ADN que codifica para el promotor de MHC $\beta$ , operativamente unida a la secuencia a), y
- c. Un vector de expresión y secreción de proteínas, que une operativamente a las secuencias a) y b).

El precursor de la proteína MMP2 (proMMP2) es la forma proenzimática latente de la proteína MMP2, con capacidad de convertirse en su forma activa en células con la maquinaria adecuada.

Las MMPs se expresan como proenzimas latentes (Visse, R. and Nagase, H "Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function and biochemistry" *Circ Res* 92 (8): 827-839). Así en la presente invención, se emplea la

proteína proMMP2 (precursor de MMP2 madura) para que las condiciones sean lo más aproximadas a las fisiológicas y que las modificaciones postrascricionales se realicen en el interior de la célula como si fuera una proteína endógena, facilitando así su correcto funcionamiento.

5

La construcción génica de la invención, junto con la posterior expresión y secreción de la proteína MMP2 en la célula diana y en el momento adecuado, constituye el sistema de alerta fibrogenético de la presente invención.

10 Tal y como se utiliza en esta invención, la expresión "operativamente unida" se refiere a que la proteína precursor de la proteína MMP2, proMMP2, se expresa en el marco de lectura correcto bajo el control de la secuencia de ADN que codifica para el promotor de MHC $\beta$ , por medio del vector de expresión y secreción de proteínas.

15 En una realización particular, el vector de expresión y secreción de proteínas empleado en la construcción génica de la invención es un vector no viral, tal como un plásmido de ADN de expresión proteica capaz de ser internalizado en células eucariotas, por ejemplo, en células animales, y que se une a los dos insertos (secuencias de ADN a) y b)) para  
20 generar la construcción génica de la invención, que, cuando se introduce en una célula huésped, promueve la expresión de la proteína MMP2 de forma transitoria (transfección transitoria), sin integrarse en el DNA genómico de la célula, o estable (transfección estable)

25 El vector puede contener, además, los elementos necesarios para la expresión de la proteína, así como los elementos reguladores de su transcripción y/o traducción. Asimismo, el vector puede contener secuencias de procesamiento de ARN tales como secuencias de intrones para el splicing de un transcrito, secuencias de terminación de transcripción, secuencias para la secreción de la proteína etc. El vector, si se desea, puede contener un origen de replicación y un marcador seleccionable, tal como un gen de  
30 resistencia a un antibiótico

De forma preferida, el vector empleado en la construcción génica de la presente invención es pSecTag2A El vector pSecTag2A es un vector de expresión de proteínas diseñado para la secreción de las mismas. Incluye una señal de secreción para la  
35 proteína sintetizada, dicha señal es de la región V-J2-C de la cadena kappa de Ig de ratón para la secreción eficaz de proteínas recombinantes, se llama señal de secreción Igk Guia (ATG-IgK Guia) y se encuentra en la región N-terminal (ver figura 1).

40 En una realización preferida, la construcción génica de la invención está formada por un inserto de ADN que codifica para proMMP2 (h-proMMP2), con secuencia mostrada en SEQ ID NO 1, un inserto de ADN que codifica para el promotor de MHC $\beta$ , con secuencia mostrada en SEQ ID NO 2, y por el vector pSecTag2A, con secuencia mostrada en SEQ ID NO 3. La construcción génica así formada está constituida por la secuencia de 9748 pb mostrada en la SEQ ID NO 4.

45

Los tres componentes de los que consta esta realización pretenda de la invención son de acceso público, tanto en compañías como en laboratorios bioquímicos, el vector de expresión pSecTag2A (Thermofisher scientific, Mammalian Expression Vectors, referencia: V90020) y los dos insertos o secuencias de ADN (primer inserto proMMP2,  
50 metaloproteinasa de matriz-2, Origene, referencia SC321560; Segundo inserto: MHC $\beta$ , promotor de miosina de cadena pesada  $\beta$ , Addgene, referencia 53963).

La obtención de la construcción génica de la invención puede realizarse por métodos convencionales conocidos por el experto en la materia, así como técnicas habituales de

inserción de ADN molecular en un vector de expresión génica comercial (Sambrook *et al*, 1989).

De forma general el método para la obtención de la construcción génica de la invención (de aquí en adelante método de la invención) comprende los siguientes pasos:

Linearizar el vector de expresión y secreción de proteínas

Introducir en el vector linearizado las dos secuencias de ADN a) y b) (secuencia de ADN que codifica para la proteína proMMP2 y secuencia de ADN que codifica para el promotor de MHC $\beta$ ) y

Obtención del don "promotor de MHC $\beta$ -vector-proMMP2", o construcción génica de la invención.

En una realización pretenda, el vector de expresión y secreción de proteínas empleado en el método de la invención es el vector pSecTag2A.

El método de obtención de esta construcción génica (promotor de MHC $\beta$ -pSecTag2A-proMMP2) comprende los siguientes pasos:

i. Linearizar el vector de expresión pSecTag2A en su región de múltiples sitios de clonación (MCS) mediante el empleo de enzimas de restricción;

ii. Introducir la secuencia de ADN de proMMP2 (a) en la región MCS del vector pSecTag2A (c) mediante la utilización de ADN ligasa para la unión de los dos fragmentos de ADN con extremos complementarios.

iii. Obtención del clan proMMP2-pSecTag2A;

iv. Linearizar el clan proMMP2-pSecTag2A y deleccionar la región promotora CMV (citomegalovirus) mediante el empleo de enzimas de restricción;

v. Introducir la secuencia de ADN del promotor de MHC $\beta$  (b) en la región promotora CMV del vector deleccionada previamente en iv) mediante la utilización de ADN ligasa; y

vi. Obtención del clan "promotor de MHC $\beta$ -pSecTag2A-proMMP2", que constituye una molécula única e intacta de ADN.

En una realización preferida del método de la invención, en el paso vi), el clan obtenido (promotor de MHC $\beta$ -pSecTag2A-proMMP2) tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO 4.

En otro aspecto principal de la invención se contempla una célula aislada transfectada con la construcción génica de la invención, donde el vector permite la expresión de la proteína MMP2 y donde dicho proteína se secreta extracelularmente.

En realizaciones particulares de la invención, la célula es un cardiomiocito.

La transfección puede ampliarse a otros tipos celulares específicos que también posean la maquinaria celular adecuada de síntesis de MHC $\beta$  como pueden ser los fibroblastos, osteoblastos, etc. La transfección del gen proMMP2 se puede llevar a cabo mediante

técnicas habituales en el estado de la técnica, como la electroporación o la incorporación mediante liposomas.

En realizaciones particulares, el gen proMMP2 se expresa transitoriamente y no se inserta en el genoma nuclear, por lo que el ADN de proMMP2 será un DNA exógeno que se pierde cuando la célula entra en mitosis.

En otras realizaciones particulares, se contempla la transfección estable de la invención. para que el gen transfectado permanezca en el genoma de la célula y de su progenie.

En otro aspecto principal de la invención se contempla una composición farmacéutica que comprende, al menos, una cantidad terapéuticamente eficaz de un ingrediente activo seleccionado de entre la construcción génica de la invención, y la célula transfectada de la invención, para su empleo en el tratamiento de la fibrosis cardíaca.

Se contempla la posibilidad de la incorporación a dicha composición de excipientes para DNA como puedan ser sacarosa, trehalosa, maltosa o lactosa en una composición: excipiente/DNA u otros componentes para vehiculizar la terapia génica de la presente invención (AAPS PharmSciTech. 2010 Mar; 11(1): 344-350. doi: 10.1208/s12249-010-9391-2. "Naked Plasmid DNA Formulation: Effect of Different Disaccharides on Stability after Lyophilisation". Susanne G. L Quaak, corresponding author John B.A. G. Haanen, Jos H. Beijnen, and Bastiaan Nuijen) (Schiff base-Poloxamer P85 combination demonstrates chemotherapeutic effect on prostate cancer cell in vitro. Demirci S, Doğan A, Türkmen NB, Telci D. Rizvanov AA. Şahin F. Biomed Pharmacother. 2017 Feb;86:492-501) (In vitro study of the cytotoxic and genotoxic effects of indomethacin-loaded Eudragit(®) L 100 nanocapsules. Froder JG, Dupeyrón D, Carvalho JC, Maistro EL Genet Mol Res. 2016 Aug 12; 15(3), doi: 10.4238/gmr.15038727).

La introducción del sistema de alerta fibrogenético en células del corazón (cardiomiocitos) permite la secreción de la proteína MMP2 fuera de la célula sólo en el momento que el corazón empieza a responder a un daño cardíaco. El corazón responde a la mayor parte de daños que conllevan fibrosis mediante la expresión de MHC $\beta$ , proteína que es específica del momento de remodelado cardíaco patológico MMP2 es capaz de secretarse fuera del cardiomiocito por la capacidad del vector pSecTag2A de expulsar la proteína sintetizada. Por lo tanto cuando el corazón empieza a sufrir daño, y no antes ni después, se pone en funcionamiento la maquinaria de síntesis y secreción de MMP2 que liberará de la fibrosis que se comienza a generar en dicho corazón.

Además, es posible la administración del "sistema de alerta fibrogenético" a cualquier célula de un organismo sin peligro de que se produzcan efectos en lugares no deseados o efectos en el corazón cuando esté sano, ya que sólo expresará MMP2 en los cardiomiocitos cuya maquinaria de expresión de MCH $\beta$  se active, es decir en cardiomiocitos que comiencen el remodelado cardíaco, lo que indica un corazón con daño patológico. Por lo tanto el sistema de alerta fibrogenético de la invención es completamente específico para el corazón y, además, para corazón en estado de remodelación, es decir un corazón no sano. No actúa por tanto en ningún otro órgano o en corazones sanos.

## Ejemplos

### Ejemplo 1.

#### 5 *Construcción del sistema de alerta fibrogenético*

El gen h-proMMP2 (SEQ ID NO 1), cuya secuencia nucleotídica de ADN se muestra en la SEQ ID NO 5, se digirió con las enzimas de restricción HindIII y XhoI para extraerlo del vector pSGL5, y se amplificó con HindIII+1nt (C)-CDS-+1 nt+XhoI.

10

El vector de expresión pSecTag2A (SEQ ID NO 3) es circular, por lo que se linearizó en su región de múltiples sitios de clonación (MCS) mediante la utilización de las enzimas de restricción HindIII y XhoI. Una vez linearizado, y mediante la utilización de la enzima ADN ligasa, se unió el inserto de proMMP2, con 1977 pares de bases (bp): Homo sapiens matrix metalloproteinase 2 (MMP2), transcript variant 1, mRNA NM 004530 (NCBI, Nucleotide, GenBank) desde bp 1 a 1977, con un total de 1977 bp (SEQ ID NO 1) en la región MCS del vector pSecTag2A mediante la utilización de los sitios de clonación (AAGCTT: sitio HindIII+1nt (C) y CTCGAG: +1ntXho (C)) generando así el clon: proMMP2-pSecTag2A

20

Posteriormente se sintetizó la secuencia de proMHCβ (región promotora de la miosina pesada de cadena β), (NCBI, número de acceso: L07306.1 de 3336 pb, la secuencia comprendida entre 1 y 3336 bp) de SEQ ID NO 2.

25

A continuación se linearizó el clon proMMP2-pSecTag2A, delecionando la región promotora CMV usando de nuevo enzimas de restricción (en este caso MluI y NheI). Así, se sustituyó el promotor citomegalovirus (CMV) del vector pSecTag2A por el promotor proMHCβ (figura 1 (2)), utilizando los sitios de clonación MluI-NheI (ACGCGT: sitio MluI; GCTAGC: sitio NheI).

30

Así se obtuvo el clon final: promotor MHCβ-pSecTag2A-proMMP2 (ver figura 1), de 9748 pb (SEQ ID NO 4), que constituye la construcción génica de la invención (figura 1 (3)) y que junto con la posterior expresión y secreción de la proteína MMP2 en la célula diana y en el momento adecuado constituye el sistema de alerta fibrogenético de la presente invención.

35

### Ejemplo 2.

#### *Cultivo de fibroblastos y transfección del "sistema de alerta fibrogenético"*

40

La línea celular NIH-3T3 de fibroblastos se cultivó en DMEM suplementado con DBS al 10% y penicilina-estreptomicina 100 U / ml, a 37°C con 5% de suministro de CO<sub>2</sub> y en placas de petri de 60 mm a una densidad de 1 x 10<sup>5</sup> células. Cuando llegaron al 80% de confluencia se transfectaron con la construcción génica de la invención en presencia del reactivo de transfección, Fugene HD, en relación 3:1 frente al DNA que se transfectaba.

45

Se añadió TGFβ1 recombinante (0,3 ng/ml) 4 h después de la transfección para activar una mayor expresión de MHCβ.

50

A las 24 horas se separó el medio extracelular y se concentró 10 veces mediante el kit de concentración de proteínas "Centricon centrifuga! Filter". Finalmente, se congeló la muestra a -20°C para su uso posterior.

*Determinación de la expresión proteica del "sistema de alerta fibrogenético"*

Mediante la técnica de Western blot se detectó la presencia en el medio extracelular del "sistema de alerta fibrogenético" (expresión de la proteína MMP2) marcado en el e-terminal con el epitopo c-myc para su detección con el anticuerpo primario anti c-myc presente en el vector pSecTag2A (vector de expresión y secreción del sistema de alerta fibrogenético) y su diferenciación de la MMP2 endógena (figura 2A). En la figura 28 se puede observar el densitograma de la media de 3 western blots medido en unidades arbitrarias de densidad óptica y en la figura 2A un WB representativo de la presencia en el medio extracelular de MMP2 del sistema de alerta fibrogenético, y no de la MMP2 endógena, con su control de carga proteico gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), que informa que existe la misma cantidad de proteína en todas las calles.

*Determinación de expresiones de ARNm por q-PCR*

Las muestras de ARN mensajero de células NIH-3T3 se obtuvieron mediante extracción de TRIzol (Invitrogen). El ARNm fue transcrito inversamente usando randomprimers. La PCR cuantitativa (q-PCR) se realizó con cebadores TaqMan específicos para MHCβ y el control que se utilizó fue el gen 18S. En la figura 2C se puede observar la expresión génica mediante q-PCR de MHCβ antes y después de la adición de TGFβ recombinante, demostrándose que este tipo celular (fibroblastos NIH-3T3) posee la maquinaria de expresión de MHCβ y que al ser activada por la presencia de TGFβ esta maquinaria se unirá al promotor de MHCβ presente en el "Sistema de alerta fibrogenético" expresando y secretando MMP2 como se observa en la figura 2A.

*Programa de estadísticas y gráficos*

El conjunto de datos se evaluó mediante la prueba de t de student  $p < 0,001^{**}$ . Se utilizó el programa GraphPad Prism 5.03 para la realización de las gráficas. El programa ImageJ se utilizó para la cuantificación densitométrica de las bandas obtenidas en los western blots.

Los valores, representados en la figura 2 8 y C, corresponden al promedio de tres experimentos independientes.

Ejemplo 3.*Zimografía que detecta la actividad como degradador de fibras del "sistema de alerta fibrogenético"*

La detección de la actividad de MMPs se evaluó por zimografía, como se describió anteriormente en X. Hu, C. Beeton. "Detection of functional matriz metalloproteinases by zymography. J Vis. Exp., 45 (2010), p. 2445. Esta técnica detecta la actividad hidrolítica de la MMP2 en presencia de su sustrato (gelatina). Las muestras para análisis se obtienen del medio extracelular tras transfectar las células NIH-3T3 con el "sistema de alerta fibrogenético". Se cargaron 20 microgramos de proteínas por ensayo de electroforesis en gel SDS-PAGE al 10% que contenía gelatina al 1% y tampón no reductor. Después de correr el gel se renaturalizaron las proteínas a través de incubación en Triton X-100 (2,5% en tris 50 mM, pH 7,4, CaCl<sub>2</sub> 5 mM y ZnCl<sub>2</sub> 1 μM) durante 30 minutos con agitación suave a temperatura ambiente. El gel se incubó durante 12 horas a 37°C con tampón de revelado (Tris 50 mM. pH 7B4, CaCl<sub>2</sub> 5 mM y 1 μM de ZnCl<sub>2</sub>). El gel se tiñó con 0,5% de Coomassie Blue G250 (en etanol al 30% y ácido acético al 10%) durante 30 min para observar la gelatina hidrolizada (Figura 3 A). La tinción se detuvo con ácido acético al 2%. Se escanearon bandas y se midió la densidad óptica usando el

software ImageJ. Las bandas problema se normalizaron a las muestras de control en el mismo gel y los datos de tres experimentos independientes se expresaron como actividad relativa de intensidad de densidad óptica (Figura 3 B). Se usó como control de carga una proteína inespecífica de la electroforesis tras tinción con Coomassie Blue G250 (gel representativo en la Figura 3 A).

Los resultados mostraron el incremento de la actividad enzimática como gelatinasa del "sistema de alerta fibrogenético" tras activar la expresión de MHC $\beta$  añadiendo TGF $\beta$  recombinante (0,3 ng/ml) (Figura 3 B).

En la figura 3 A se puede ver una imagen de la degradación del sustrato gelatina al ponerlo en contacto con el medio extracelular de células NIH-3T3 que contienen "sistema de alerta fibrogenético" y su control de carga (proteína inespecífica en tinción de coomasie blue) Asimismo, la figura 3 8 incluye un denstiograma que indica el aumento significativo de la degradación de gelatina al añadir TGF $\beta$  al medio celular y, en consecuencia, aumentar la presencia de MMP2 extracelular del "sistema de alerta fibrogenético", como se mostraba en la figura 2 A y B.

## REIVINDICACIONES

1. Construcción génica que comprende:

- a) Una secuencia de ADN que codifica para la proteína proMMP2,
- b) Una secuencia de ADN que codifica para el promotor de MHC- $\beta$ , operativamente unida a la secuencia a), y
- c) Un vector de expresión y secreción de proteínas que une operativamente a las secuencias a) y b).

2. Construcción génica, según la reivindicación 1, donde el vector es pSecTag2A.

3. Construcción génica, según la reivindicación 2, de SEQ ID NO 4.

4. Célula aislada transfectada con una construcción génica, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el vector proporciona la expresión de la proteína MMP2 y su secreción extracelular.

5. Célula, según la reivindicación 4, donde la célula es un cardiomiocito.

6. Composición farmacéutica que comprende al menos un ingrediente activo seleccionado de entre la construcción génica de la reivindicación 1, y la célula de la reivindicación 4, para su empleo en el tratamiento de la fibrosis cardíaca.

7. Método para la obtención de la construcción génica de la reivindicación 1 que comprende los siguientes pasos.

- Linearizar el vector de expresión y secreción de proteínas (e).
- Introducir en el vector linearizado las dos secuencias a) y b) de ADN, y
- Obtención del clan: promotor de MHC $\beta$ -vector-proMMP2.

8. Método según la reivindicación 7, donde el vector es pSecTag2A.

9. Método según la reivindicación 8 que comprende los siguientes pasos:

- i. Linearizar el vector de expresión pSecTag2A en su región de múltiples sitios de clonación (MCS) mediante el empleo de enzimas de restricción,
- ii. Introducir la secuencia de ADN de proMMP2 (a) en la región MCS del vector pSecTag2A,
- iii. Obtención del clan: proMMP2-pSecTag2A,
- iv. Linearizar el clan proMMP2-pSecTag2A seleccionando la región promotora citomegalovirus (CMV) mediante el empleo de enzimas de restricción,
- v. Introducir la secuencia de ADN del promotor de MHC $\beta$  (b) en la región promotora CMV del vector seleccionada en iv), y
- vi. Obtención del clan: promotor de MHC $\beta$ -pSecTag2A-proMMP2.



10. Método según la reivindicación 9 donde el clan obtenido en el paso vi) tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO 4.

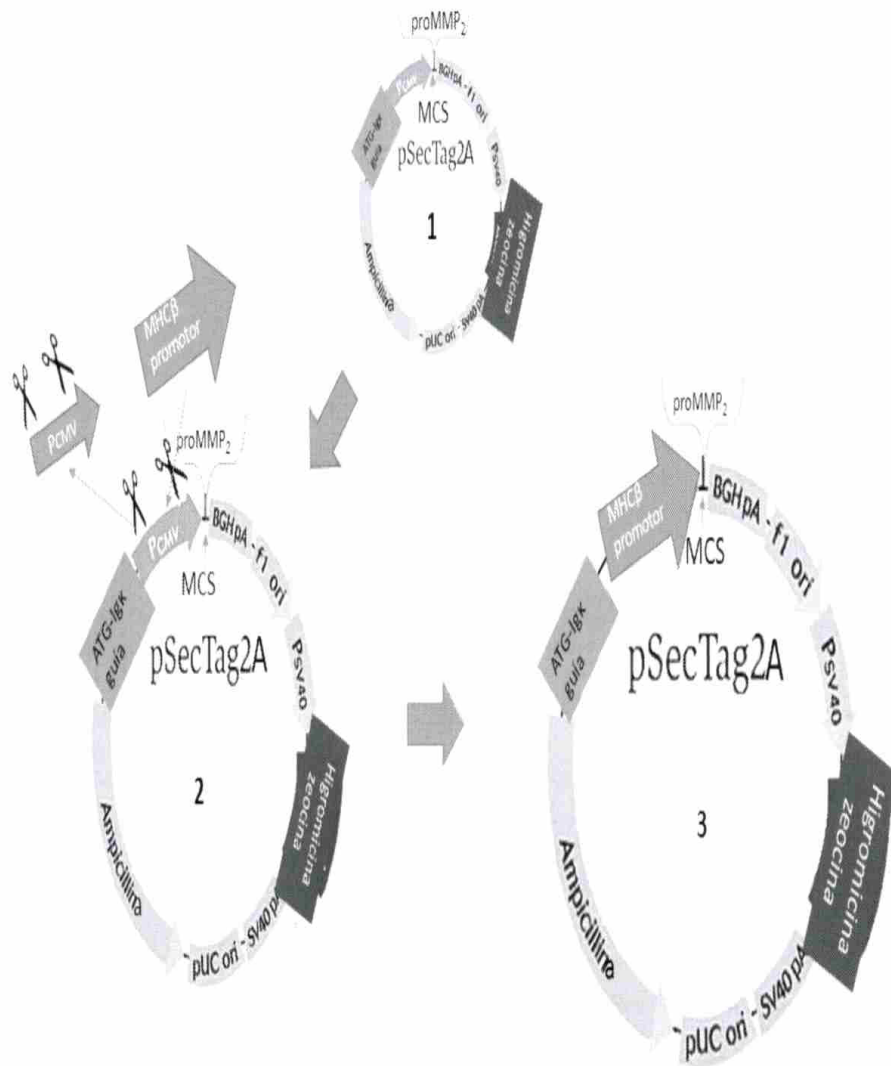


FIGURA 1

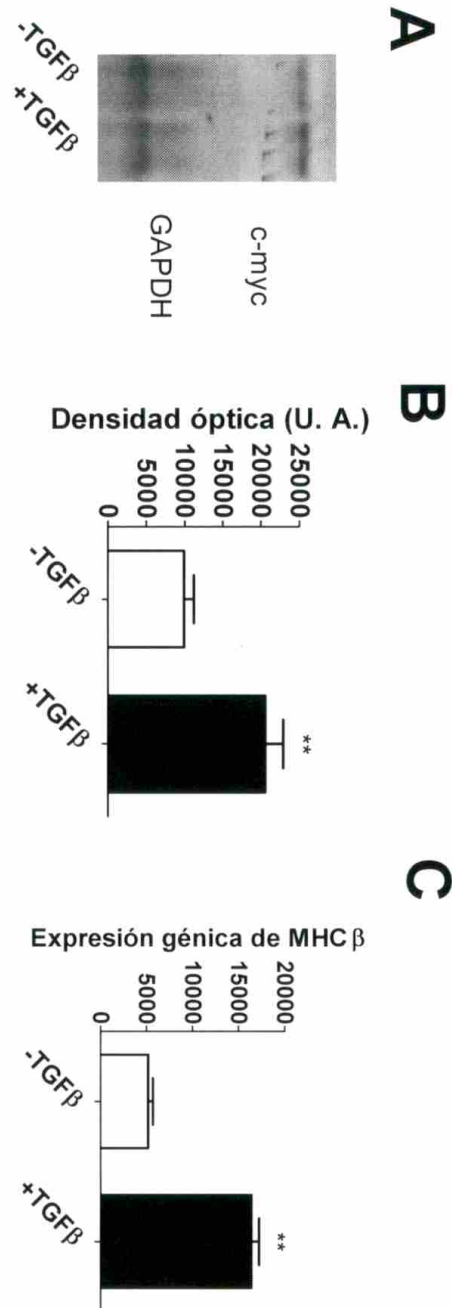


FIGURA 2

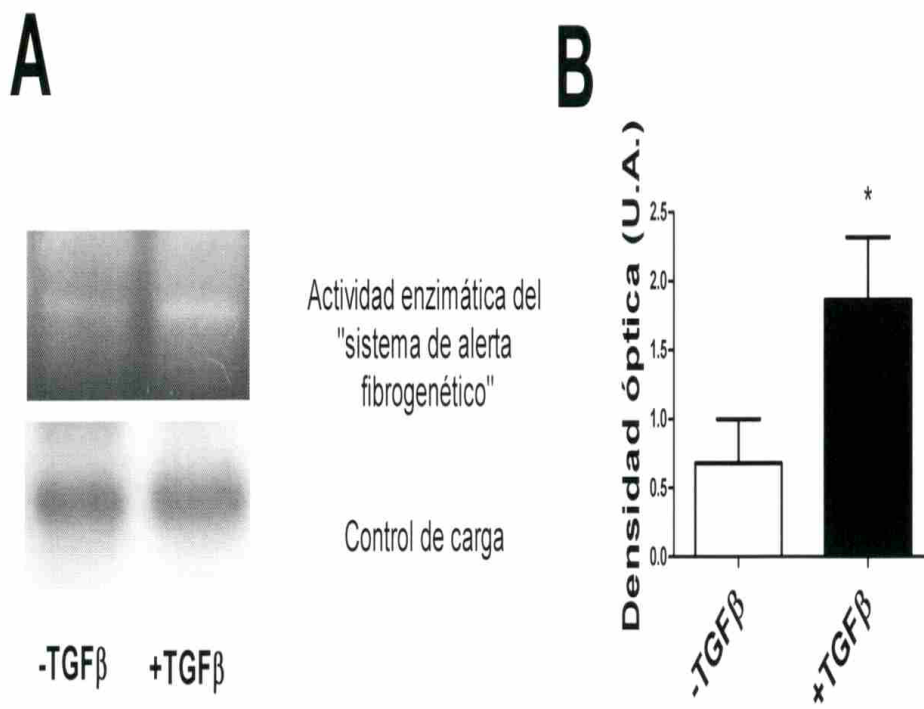


FIGURA 3

## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> UNIVERSIDAD DE CANTABRIA  
 <120> Construcción génica y su empleo en el tratamiento de la fibrosis cardíaca  
 <130> 254/16  
 <160> 5  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 1977  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <223> gen hpromMP2  
 <400> 1  
 gaggcgctaa tggccccggg cgcgctcacg ggtcccctga gggcgctctg tctcctgggc 60  
 tgcctgctga gccacgccgc cgccgcgccg tcgcccacatca tcaagttccc cggcgatgtc 120  
 gcccccaaaa cggacaaaga gttggcagtg caatacctga acaccttcta tggctgcccc 180  
 aaggagagct gcaacctgtt tgtgctgaag gacacactaa agaagatgca gaagttcttt 240  
 ggactgcccc agacaggtga tcttgaccag aataccatcg agaccatgcg gaagccacgc 300  
 tgcggcaacc cagatgtggc caactacaac ttcttcctc gcaagcccaa gtgggacaag 360  
 aaccagatca catacaggat cattggctac acacctgatc tggaccaga gacagtggat 420  
 gatgcctttg ctctgtcctt ccaagtctgg agcgatgtga cccactgcg gttttctcga 480  
 atccatgatg gagaggcaga catcatgatc aactttggcc gctgggagca tggcgatgga 540  
 taccctttg acggttaagga cggactcctg gctcatgcct tcgccccagg cactggtggt 600  
 gggggagact cccattttga tgacgatgag ctatggacct tgggagaagg ccaagtggtc 660  
 cgtgtgaagt atgggaacgc cgatggggag tactgcaagt tccccttctt gttcaatggc 720  
 aaggagtaca acagctgcac tgataccggc cgcagcgatg gcttcctctg gtgctccacc 780  
 acctacaact ttgagaagga tggcaagtac ggcttctgtc cccatgaagc cctgttcacc 840  
 atgggcggca acgctgaagg acagccctgc aagtttccat tccgcttcca gggcacatcc 900  
 tatgacagct gcaccactga gggccgcacg gatggctacc gctggtgcgg caccactgag 960  
 gactacgacc gcgacaagaa gtatggcttc tgccctgaga ccgcatgtc cactgttggt 1020  
 gggaactcag aagggtgcccc ctgtgtcttc cccttcactt tcctgggcaa caaatatgag 1080  
 agctgcacca gcgccggccg cagtgcgga aagatgtggt gtgcgaccac agccaactac 1140  
 gatgatgacc gcaagtggg cttctgccct gaccaagggt acagcctgtt cctcgtggca 1200  
 gccacagagt ttggccacgc catggggctg gagcactccc aagaccctgg ggccctgatg 1260  
 gcacccattt acacctacac caagaacttc cgtctgtccc aggatgacat caagggcatt 1320  
 caggagctct atggggcctc tcctgacatt gaccttgga ccggccccac cccacgctg 1380

# ES 2 620 702 A1

ggccctgtca	ctcctgagat	ctgcaaacag	gacattgtat	ttgatggcat	cgctcagatc	1440
cgtggtgaga	tcttcttctt	caaggaccgg	ttcatttggc	ggactgtgac	gccacgtgac	1500
aagcccatgg	ggccctgtct	ggtggccaca	ttctggcctg	agctcccgga	aaagattgat	1560
gcggtatacg	aggccccaca	ggaggagaag	gctgtgttct	ttgcagggaa	tgaatactgg	1620
atctactcag	ccagcaccct	ggagcgaggg	tacccaagc	cactgaccag	cctgggactg	1680
ccccctgatg	tccagcgagt	ggatgccgcc	tttaactgga	gcaaaaacaa	gaagacatac	1740
atctttgctg	gagacaaatt	ctggagatac	aatgaggtga	agaagaaaat	ggatcctggc	1800
ttccccaagc	tcatcgcaga	tgcttggaa	gccatccccg	ataacctgga	tgccgtcgtg	1860
gacctgcagg	gcggcggtca	cagctacttc	ttcaaggtg	cctattacct	gaagctggag	1920
aaccaaaagtc	tgaagagcgt	gaagtttgg	agcatcaa	ccgactggct	aggctgc	1977

<210> 2  
 <211> 3336  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <223> gen de miosina de cadena pesada  $\beta$ , extremo 5'(región promotora y exones 1 a 6)

<400> 2	
gaattcctgt	gtccaaactc tctggtccta acaggaacct actaccttct atctgctcca 60
atccaaccac	cataccagag ccatgcccc aactctgccc tgccccctctc agctgctgtg 120
acccaacccc	ttcccacctc agacagatgc aggactcaag ccaggagtgt ggggaggata 180
ctggaaatag	ggccaggcta gcaactgggg caaggcttct aagggggcag caatgccagg 240
gtcagcagga	ccctcttgca ggccagccag ggccttgccct gcttgaggtc gtggtggctg 300
tggtcagctt	actctctagt gagccgtgga atgttagaga tatttttgct tcactttaag 360
ctgccccacc	ccctggaact cagaccctga acatgccatg ccacaacaat gacgaccact 420
tccaattgtt	tcctagctgg gggaggaggg gggagtactg ttgggacaag ggaagggggg 480
gagagtcggg	ggggaaatgc ttttagtgac aacagccctt tctaaatctg gctagggact 540
gggtgcaggt	gggggatggg gcaccctgct gccccatata tacagcccct gagaccaggt 600
ctggctctga	gcattctcct gctgtttcct tacttgctac cctcaggtag gagtgggagc 660
tggaggcttc	cctctgggat aaggggctcc aggttcagga agtaattcct ctagaacagc 720
agcgggcttc	tggcatgtag taccaggtta tcattgaaca ctctgtgca gatctaaata 780
cgcatgcttg	tgccgtagga atgtgggagc ccaagtgttc caaggtgggg ggtggatatc 840
tatatgtgca	tatggcccag aatgcaatag cagtgtgtga gcatgtgcgt gcatgtgtgc 900
gtgtgcaagt	acaagcacac atatcttaaa tgtaaggatc agtttatatt ttatcacata 960
aggtacctca	tgcttggtta caagcatttt ggcagaagag ggacagaatg atggagaata 1020
actcttaagg	aagccagttc tgtgaacact agagcctgcc tgtgtttggg gaagtgtctg 1080
actgtacata	gaggggttat tactatgtag gatatgaccc tgcgtgtagt ctctgaaata 1140



# ES 2 620 702 A1

gcagttcaca	gacatgcagg	tgtggggggc	tctggtcttc	gtatgctgaa	gaacacgcag	1200
ccacaggagc	ctgcctatgt	gctgggctgt	ttgcacatga	acactgtggg	gagcatgtgt	1260
gctgaggatg	gaaggaagtt	tacattcacg	tcaagtgtgg	gcacaagcag	aaggcatgtg	1320
tatttatcag	ggcgtgtgca	ggggaggctg	gggtgtgcga	gggtagtcag	agggctgttg	1380
gaatcatgag	gctcgagtct	gaaatctgga	ctctgctact	tgtcctgtgc	tctgagaaaa	1440
gtaaggcttc	agcctccact	tcctcacgta	cccaaggggc	agccgtgaga	gtgaacagca	1500
agagtgcatt	gtgactattg	ttgtgttgta	gggtggctccg	agaaaggaag	cctcagcaga	1560
ggagtacagg	taagggtaga	acagcccccta	agggcggagg	actggggctc	ggaggttgtt	1620
agtctttggg	agaaaggaga	tagagcttga	aaaggaagga	tgccagtgc	cagaaaggct	1680
gaccagctct	gctaatact	cttccgcgtg	ctgaagaaca	gagccagaga	ggagggaggt	1740
gccagaagcc	aggctgggcc	acagcctgtc	ctgacaccgt	ctcttccctt	tctccagctc	1800
tcctacaggc	ctgggcttac	ctctctatca	ctagacacgt	ttgagaatcc	aagggtgagaa	1860
aagttggagt	ccaaatgttg	ggagatctgg	caaaactgca	catagttaa	gcccaggcc	1920
ccaagcccga	agcctggcag	gttcctttct	gcctgctcag	agacaatggc	ctggccagt	1980
aggggcaggg	actattgaca	gtcagagatt	gatacagagt	tctgtccccg	aaagacggtc	2040
aggacacacc	caaagagttc	cccaagtga	tgaaagtaaa	gctgccccct	tgcttgga	2100
cagttgccag	gctgctctct	ggtttagggg	tgagcctgga	gaagggtaaa	ctcctgagt	2160
ctgagcacag	taccggattt	gggagctgcc	actgagtggg	agagcccaag	gggcgggaag	2220
gcatataggt	aacagctgct	cctcacccca	ggctcagcca	tgccggatgc	agagatggct	2280
gcatttgggg	ctgcagcccc	cttcctgcgg	aagtctgaga	aggagaggct	ggaggcacag	2340
accaggccct	ttgacctcaa	gaaagatgtt	tttgtgcccc	atgacaaaga	agagtttgtc	2400
aaggccaaga	tcgtgtcccc	agaggggtgg	aaagtactg	ctgagacgga	gaatggcaag	2460
gtaggtgtcg	ggactggtgt	ggggaggcca	ctcaagagag	ccccatacct	aggggtgcca	2520
gagaggggac	aggcgtgcac	acctgaggac	ccccaagctt	cccgctcttt	gggtaggggtg	2580
ggggtccaaa	ctctcccaaa	agtctcctta	ctcccaacat	ctaactccag	tctctcctca	2640
gctatacacc	cccccccgcc	cccaactcca	taccttgccg	tgctgccctc	atgccgatag	2700
agcagggcag	acacaggttg	acatgagggc	ctctgtgggc	tgttccagac	ggtgactgtg	2760
aaggaggacc	aggatgatgca	gcagaaccca	cccaagtctg	acaagatcga	ggacatggcc	2820
atgctgacct	tcctgcatga	gccggctgtg	ctgtacaacc	tcaaggagcg	ctacgttcc	2880
tggtatgatct	atgtgagtgc	agcaccggtc	catcacccag	aaccagagc	ttcctgggca	2940
agagcagtct	cctgaagcca	agccacctac	ctgcctgtc	tgtgtccaag	gagtatggca	3000
ctctacacca	gcccctgtc	ctttggctcc	gttataaaac	cagactgatt	ctgcgcttcg	3060
ccctttgttc	ccattgtctc	ctggggctct	tctctaattc	tgacaaccac	ccctcacttg	3120
ctcttcctta	ccctcagacc	tactcggggc	tcttctgcgt	caccgtcaac	ccctacaagt	3180

# ES 2 620 702 A1

ggctgcctgt gtacaatgcg gaagtgggtg cgcctaccg gggcaagaag aggagcgagg	3240
ccccctctca catcttctcc atctctgaca acgcctatca gtacatgctg acaggtaagc	3300
ctggtgccca gacctgggtc cctcaacct gaattc	3336

<210> 3  
 <211> 5159  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Vector pSecTag2A

<400> 3 gacggatcgg gagatctccc gatccccctat ggctgactct cagtacaatc tgctctgatg	60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggctcgt gagtagtgcg	120
cgagcaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc	180
ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgag atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt	240
gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacgggggtc attagttcat agcccatata	300
tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcg tggtgaccg cccaacgacc	360
cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc	420
attgacgtca atgggtggac tatttacggg aaactgcccc cttggcagta catcaagtgt	480
atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt	540
atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttgga gtacatctac gtattagtca	600
tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg	660
actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc	720
aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc ccattgacg caaatgggag	780
gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaaccca	840
ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagaccca gctggctagc	900
caccatggag acagacacac tcctgctatg ggtactgctg ctctgggttc caggttccac	960
tgggtgacgcg gccagccgg ccaggcgcg cgtacgaagc ttggtaccga gctcggatcc	1020
actccagtgt ggtggaattc tgcagatatc cagcacagtg gcggccgctc gaggagggcc	1080
cgaacaaaaa ctcatctcag aagaggatct gaatagcgcc gtcgaccatc atcatcatca	1140
tcattgagtt taaaccgct gatcagctc gactgtgcct tctagttgcc agccatctgt	1200
tgtttgcccc tccccgtgc cttccttgac cctggaagggt gccactcca ctgtcctttc	1260
ctaataaaat gaggaaattg catcgcattg tctgagtagg tgtcattcta ttctgggggg	1320
tgggggtggg caggacagca agggggagga ttgggaagac aatagcaggc atgctgggga	1380
tgcggtgggc tctatggctt ctgaggcgga aagaaccagc tggggctcta gggggtatcc	1440
ccacgcgcc ttagcggcg cattaagcg gcggggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac	1500
cgctacactt gccagcgccc tagcgccgc tcctttcgct ttcttccctt cctttctcgc	1560



# ES 2 620 702 A1

cacgttcgcc	ggctttcccc	gtcaagctct	aaatcggggc	atccctttag	ggttccgatt	1620
tagtgcttta	cggcacctcg	acccccaaaa	acttgattag	ggtgatgggt	cacgtagtgg	1680
gccatcgccc	tgatagacgg	tttttcgccc	tttgacgttg	gagtccacgt	tctttaatag	1740
tggactcttg	ttccaaactg	gaacaacact	caaccctatc	tcggtctatt	cttttgattt	1800
ataagggatt	ttgggggattt	cggcctattg	gttaaaaaat	gagctgattt	aacaaaaatt	1860
taacgcgaat	taattctgtg	gaatgtgtgt	cagttagggg	gtggaaagtc	cccaggctcc	1920
ccagcaggca	gaagtatgca	aagcatgcat	ctcaattagt	cagcaaccag	gtgtggaaag	1980
tccccaggct	ccccagcagg	cagaagtatg	caaagcatgc	atctcaatta	gtcagcaacc	2040
atagtcccg	ccctaactcc	gccccatccc	cccctaactc	cgcccagttc	cgcccattct	2100
ccgccccatg	gctgactaat	tttttttatt	tatgcagagg	ccgaggccgc	ctctgcctct	2160
gagctattcc	agaagtagtg	aggaggcttt	tttgagggcc	taggcttttg	caaaaagctc	2220
ccgggagctt	gtatatccat	tttcggatct	gatcagcacg	tggtgacaat	taatcatcgg	2280
catagtatat	cggcatagta	taatacgaca	aggtagaggaa	ctaaaccatg	gccaagttga	2340
ccagtgccgt	tccggtgctc	accgcgcgcg	acgtcgccgg	agcggtcgag	ttctggaccg	2400
accggctcgg	gttctccccg	gacttcgtgg	aggacgactt	cgccggtgtg	gtccgggacg	2460
acgtgaccct	gttcatcagc	gcggtccagg	accagggtgg	gccggacaac	accctggcct	2520
gggtgtgggt	gcgcggcctg	gacgagctgt	acgccgagtg	gtcggaggtc	gtgtccacga	2580
acttccggga	cgcttccggg	ccggccatga	ccgagatcgg	cgagcagccg	tgggggcggg	2640
agttcgccct	gcgcgacccg	gccggcaact	gcgtgcactt	cgtggccgag	gagcaggact	2700
gacacgtgct	acgagatttc	gattccaccg	ccgccttcta	tgaaagggtg	ggcttcggaa	2760
tcgttttccg	ggacgccggc	tggatgatcc	tccagcgcgg	ggatctcatg	ctggagttct	2820
tcgcccaccc	caacttgttt	attgcagctt	ataatggtta	caaataaagc	aatagcatca	2880
caaatttcac	aaataaagca	tttttttcac	tgcattctag	ttgtggtttg	tccaaactca	2940
tcaatgtatc	ttatcatgtc	tgtataccgt	cgacctctag	ctagagcttg	gcgtaatcat	3000
ggtcatagct	gtttcctgtg	tgaaattggt	atccgctcac	aattccacac	aacatacgag	3060
ccggaagcat	aaagtgtaaa	gcctgggggtg	cctaattgagt	gagctaactc	acattaattg	3120
cgttgcgctc	actgcccgtc	ttccagtcgg	gaaacctgtc	gtgccagctg	cattaatgaa	3180
tcggccaacg	cgcgggggaga	ggcggtttgc	gtattgggcg	ctcttccgct	tcctcgctca	3240
ctgactcgct	gcgctcggtc	gttcggctgc	ggcgagcggt	atcagctcac	tcaaaggcgg	3300
taatacgggt	atccacagaa	tcaggggata	acgcaggaaa	gaacatgtga	gcaaaaggcc	3360
agcaaaaggc	caggaaccgt	aaaaaggccg	cgttgctggc	gtttttccat	aggctccgcc	3420
cccctgacga	gcatcacaaa	aatcgacgct	caagtcagag	gtggcgaaac	ccgacaggac	3480
tataaagata	ccaggcggtt	ccccctggaa	gctccctcgt	gcgctctcct	gttccgaccc	3540
tgccgcttac	cggatacctg	tccgcctttc	tcccttcggg	aagcgtggcg	ctttctcaat	3600

# ES 2 620 702 A1

gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc	3660
acgaaccccc cggttcagccc gaccgctgcg ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca	3720
acccggtaag acacgactta tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag	3780
cgaggatatgt aggcgggtgct acagagttct tgaagtgggtg gcctaactac ggctacacta	3840
gaaggacagt atttgggtatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg	3900
gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc	3960
agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt tctacgggggt	4020
ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa	4080
ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaaa aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat	4140
atgagtaaac ttgggtctgac agttaccaat gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga	4200
tctgtctatt tcgttcatcc atagttagcct gactccccgt cgtgtagata actacgatac	4260
gggagggcctt accatctggc cccagtgcgt caatgatacc gcgagacca cgctcaccgg	4320
ctccagattt atcagcaata aaccagccag ccggaagggc cgagcgcaga agtggtcctg	4380
caactttatc cgcctccatc cagtctatta attgttgccg ggaagctaga gtaagtagtt	4440
cgccagttaa tagtttgcgc aacgttggtt ccattgctac aggcacgtg gtgtcacgct	4500
cgtcgtttgg tatggcttca ttcagctccg gttcccaacg atcaaggcga gttacatgat	4560
cccccatggt gtgcaaaaaa gcggttagct ccttcgggtcc tccgatcgtt gtcagaagta	4620
agttggccgc agtgttatca ctcatggta tggcagcact gcataattct cttactgtca	4680
tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat	4740
agtgtagcgc gcgaccgagt tgctcttgcc cggcgtcaat acgggataat accgcgccac	4800
atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg gaaaacgttc ttcggggcga aaactctcaa	4860
ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga tgtaaccac tcgtgcaccc aactgatctt	4920
cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa aacaggaagg caaaatgccg	4980
caaaaaaggg aataagggcg acacggaaat gttgaatact catactcttc ctttttcaat	5040
attattgaag catttatcag ggttattgtc tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt	5100
agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca catttccccg aaaagtgcc cctgacgtc	5159

<210> 4

<211> 9748

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sistema de alerta fibrogenético

<400> 4

gacggatcgg gagatctccc gatccccctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg	60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gagtagtgcg	120
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc	180



# ES 2 620 702 A1

ttaggggttag	gcgttttgcg	ctgcttcgcg	atgtacgggc	cagatatacg	cgtgaattcc	240
tgtgtccaaa	ctctctggtc	ctaacaggaa	cctactacct	tctatctgct	ccaatccaac	300
caccatacca	gagccatgcc	cccaactctg	ccctgcccct	ctcagctgct	gtgacccaac	360
cccttcccac	ctcagacaga	tgcaggactc	aagccaggag	tgtggggagg	atactggaaa	420
tagggccagg	ctagcactgg	gggcaaggct	tctaaggggg	cagcaatgcc	agggtcagca	480
ggaccctctt	gcaggccagc	cagggccttg	cctgcttgag	gtcgtggtgg	tcgtggtcag	540
cttactctct	agtgagccgt	ggaatgttag	agatattttt	gcttcacttt	aagctgcccc	600
accccttggg	actcagaccc	tgaacatgcc	atgccacaac	aatgacgacc	acttccaatt	660
gtttcctagc	tgggggagga	ggggggagta	ctgtttggac	aaggggaagg	ggggagagtc	720
gggggggaaa	tgcttttagt	gacaacagcc	ctttctaaat	ctggctaggg	actgggtgca	780
gggtgggggat	ggggcaccct	gctgccccat	atatacagcc	cctgagacca	ggctctggctc	840
tgagcattct	cctgctgttt	ccttacttgc	taccctcagg	taggagtggg	agctggaggc	900
ttccctctgg	gataaggggc	tccaggttca	ggaagtaatt	cctctagaac	agcagcgggc	960
ttctggcatg	tagtaccagg	ttatcattga	acactcctgt	gcagatctaa	atacgcatgc	1020
ttgtgccgta	ggaatgtggg	agcccaagtg	ttccaagggt	gggggtggat	atctatatgt	1080
gcatatggcc	cagaatgcaa	tagcagtgtg	tgagcatgtg	cgtgcatgtg	tgcgtgtgca	1140
agtacaagca	cacatatctt	aaatgtaagg	atcagtttat	attttatcac	ataaggtacc	1200
tcatgcctgg	ttacaagcat	tttggcagaa	gagggacaga	atgatggaga	ataactctta	1260
aggaagccag	ttctgtgaac	actagagcct	gcctgtgttt	ggggaagtgt	ctgactgtac	1320
atagaggggt	tattactatg	taggatatga	ccctgctgtg	agtctctgaa	atagcagttc	1380
acagacatgc	aggtgtgggg	ggctctggtc	ttcgtatgct	gaagaacacg	cagccacagg	1440
agcctgccta	tgtgctgggc	tgtttgcaca	tgaacactgt	ggggagcatg	tgtgctgagg	1500
atggaaggaa	gtttacattc	acgtcaagtg	tgggcacaag	cagaaggcat	gtgtatttat	1560
cagggcgtgt	gcaggggagg	ctgggggtgt	cgagggtagt	cagagggctg	ttggaatcat	1620
gaggctcgag	tctgaaatct	ggactctgct	acttgtcctg	tgctctgaga	aaagtaaggc	1680
ttcagcctcc	acttcctcac	gtacccaagg	ggcagccgtg	agagtgaaca	gcaagagtgc	1740
attgtgacta	ttgttggtgt	gtaggtggct	ccgagaaaagg	aagcctcagc	agaggagtac	1800
aggtaagggt	agaacagccc	ctaagggcgg	aggactgggg	ctcggagggt	gttagtcttt	1860
gggagaaaagg	agatagagct	tgaaaaggaa	ggatgccagt	gaccagaaaag	gctgaccagc	1920
tctgctaata	actcttccgc	gtgctgaaga	acagagccag	agaggagggg	ggtgccagaa	1980
gccaggctgg	gccacagcct	gtcctgacac	cgtctcttcc	ctttctccag	ctctcctaca	2040
ggcctgggct	tacctctcta	tcactagaca	cgtttgagaa	tccaagggtga	gaaaagttgg	2100
agtccaaatg	ttgggagatc	tggcaaaaact	gcacatagtt	aaagcccaaa	gccccaaagcc	2160
cgaagcctgg	caggttcctt	tctgcctgct	cagagacaat	ggcctggcca	gtgagggggca	2220

# ES 2 620 702 A1

gggactattg	acagtcagag	attgatacag	agttctgtcc	ccgaaagacg	gtcaggacac	2280
acccaaagag	ttccccaagt	gaatgaaagt	aaagctgccc	ccttgccctg	gcacagttgc	2340
caggctgctc	tctggtttag	gggtgagcct	ggagaagggt	aaactcctga	gtgctgagca	2400
cagtaccgga	tttgggagct	gccactgagt	gggagagccc	aaggggcggg	aaggcatata	2460
ggtaacagct	gctcctcacc	ccaggctcag	ccatggcgga	tgcagagatg	gctgcatttg	2520
gggctgcagc	ccccttcctg	cggaagtctg	agaaggagag	gctggaggca	cagaccaggc	2580
cctttgacct	caagaaagat	gtttttgtgc	ccgatgacaa	agaagagttt	gtcaaggcca	2640
agatcggtg	ccgagagggg	ggcaaagtca	ctgctgagac	ggagaatggc	aaggtaggtg	2700
tcgggactgg	tgtggggagg	ccactcaaga	gagccccata	cctaggggtg	ccagagaggg	2760
gacaggcgtg	cacacctgag	gacccccaag	cttcccgtcc	tttgggtagg	gtgggggtcc	2820
aaactctccc	aaaagtctcc	ttactcccaa	catctaactc	cagtctctcc	tcagctatac	2880
accccccccc	gcccccaact	ccataccttg	ccgtgctgcc	ctcatgccga	tagagcaggg	2940
cagacacagg	ttgacatgag	ggcctctgtg	ggctgttcca	gacggtgact	gtgaaggagg	3000
accagggtgat	gcagcagaac	ccacccaagt	tcgacaagat	cgaggacatg	gccatgctga	3060
ccttcctgca	tgagccggct	gtgctgtaca	acctcaagga	gcgctacgct	tcctggatga	3120
tctatgtgag	tgcagcaccg	gtccatcacc	cagaaccag	agcttcctgg	gcaagagcag	3180
tctcctgaag	ccaagccacc	tacctgcctg	ctctgtgtcc	aaggagtatg	gcactctaca	3240
ccagcccctg	ctcctttggc	tccgttataa	aaccagactg	attctgcgct	tcgccctttg	3300
ttcccattgt	ctcctggggg	ctttctctaa	ttctgacaac	caccctcac	ttgctcttcc	3360
ttaccctcag	acctactcgg	gcctcttctg	cgtcaccgtc	aaccctaca	agtggctgcc	3420
tgtgtacaat	gcggaagtgg	tggccgccta	ccggggcaag	aagaggagcg	aggcccctcc	3480
tcacatcttc	tccatctctg	acaacgccta	tcagtacatg	ctgacaggta	agcctggtgc	3540
ccagacctgg	gtccccctca	cctgaattcg	ctagccacca	tggagacaga	cacactcctg	3600
ctatgggtac	tgctgctctg	ggttccaggt	tccactggtg	acgcggccca	gccggccagg	3660
cgcgccgtac	gaagcttcga	ggcgctaatt	gcccggggcg	cgctcacggg	tcccctgagg	3720
gcgctctgtc	tcctgggctg	cctgctgagc	cacgcccgcg	ccgcgccgtc	gcccctcatc	3780
aagttccccg	gcgatgtcgc	ccccaaaacg	gacaaagagt	tggcagtgca	atacctgaac	3840
accttctatg	gctgccccaa	ggagagctgc	aacctgtttg	tgctgaagga	cacactaaag	3900
aagatgcaga	agttcttttg	actgccccag	acagggtgat	ttgaccagaa	taccatcgag	3960
accatgcgga	agccacgctg	cggcaaccca	gatgtggcca	actacaactt	cttccctcgc	4020
aagcccaagt	gggacaagaa	ccagatcaca	tacaggatca	ttggctacac	acctgatctg	4080
gacccagaga	cagtggatga	tgcctttgct	cgtgccttcc	aagtctggag	cgatgtgacc	4140
ccactgcggt	tttctcgaat	ccatgatgga	gaggcagaca	tcgatgataa	ctttggccgc	4200
tgggagcatg	gcgatggata	cccctttgac	ggtaaggacg	gactcctggc	tcatgccttc	4260



# ES 2 620 702 A1

gccccaggca	ctggtgttgg	gggagactcc	cattttgatg	acgatgagct	atggaccttg	4320
ggagaaggcc	aagtgggtccg	tgtgaagtat	gggaacgccg	atggggagta	ctgcaagttc	4380
cccttcttgt	tcaatggcaa	ggagtacaac	agctgcactg	ataccggccg	cagcgatggc	4440
ttcctctggt	gctccaccac	ctacaacttt	gagaaggatg	gcaagtacgg	cttctgtccc	4500
catgaagccc	tggttcaccat	gggcggcaac	gctgaaggac	agccctgcaa	gtttccattc	4560
cgcttccagg	gcacatccta	tgacagctgc	accactgagg	gccgcacgga	tggctaccgc	4620
tgggtgcggca	ccactgagga	ctacgaccgc	gacaagaagt	atggcttctg	ccctgagacc	4680
gccatgtcca	ctgttggtgg	gaactcagaa	ggtgccccct	gtgtcttccc	cttcactttc	4740
ctgggcaaca	aatatgagag	ctgcaccagc	gccggccgca	gtgacggaaa	gatgtggtgt	4800
gcgaccacag	ccaactacga	tgatgaccgc	aagtggggct	tctgccctga	ccaagggtag	4860
agcctgttcc	tcgtggcagc	ccacgagttt	ggccacgccca	tggggctgga	gcactcccaa	4920
gaccctgggg	ccctgatggc	acccattttac	acctacacca	agaacttccg	tctgtcccag	4980
gatgacatca	agggcattca	ggagctctat	ggggcctctc	ctgacattga	ccttggcacc	5040
ggccccaccc	ccacgctggg	ccctgtcact	cctgagatct	gcaaacagga	cattgtattt	5100
gatggcatcg	ctcagatccg	tgggtgagatc	ttcttcttca	aggaccggtt	catttggcgg	5160
actgtgacgc	cacgtgacaa	gccccatggg	cccctgctgg	tggccacatt	ctggcctgag	5220
ctccccgaaa	agattgatgc	ggtatacgag	gccccacagg	aggagaaggc	tgtgttcttt	5280
gcagggaaatg	aatactggat	ctactcagcc	agcacccctg	agcgagggta	ccccaagcca	5340
ctgaccagcc	tgggactgcc	ccctgatgtc	cagcgagtgg	atgccgcctt	taactggagc	5400
aaaaacaaga	agacatacat	ctttgctgga	gacaaattct	ggagatacaa	tgaggtgaag	5460
aagaaaatgg	atcctggctt	ccccaagctc	atcgagatg	cctggaatgc	catccccgat	5520
aacctggatg	ccgtcgtgga	cctgcagggc	ggcggtcaca	gctacttctt	caagggtgcc	5580
tattacctga	agctggagaa	ccaaagtctg	aagagcgtga	agtttggaag	catcaaatcc	5640
gactggctag	gctgccctcg	aggagggccc	gaacaaaaac	tcatctcaga	agaggatctg	5700
aatagcgccg	tcgaccatca	tcatcatcat	cattgagttt	aaacccgctg	atcagcctcg	5760
actgtgcctt	ctagttgcca	gccatctgtt	gtttgccctt	cccccgctgc	ttccttgacc	5820
ctggaagggtg	ccactcccac	tgtcctttcc	taataaaatg	aggaaattgc	atcgcatgtg	5880
ctgagtaggt	gtcatttctat	tctggggggg	ggggtggggc	aggacagcaa	gggggaggat	5940
tgggaagaca	atagcaggca	tgctggggat	gcggtgggct	ctatggcttc	tgaggcgga	6000
agaaccagct	ggggctctag	ggggtatccc	cacgcgccct	gtagcggcgc	attaagcgcg	6060
gcgggtgtgg	tggttacgcg	cagcgtgacc	gctacacttg	ccagcgccct	agcgcccgc	6120
cctttcgctt	tcttcccttc	ctttctcgcc	acgttcgccc	gctttccccg	tcaagctcta	6180
aatcggggca	tccctttagg	gttccgattt	agtgccttac	ggcacctcga	ccccaaaaaa	6240
cttgattagg	gtgatggttc	acgtagtggg	ccatcgccct	gatagacggt	ttttcgccct	6300

# ES 2 620 702 A1

ttgacgttgg agtccacgtt ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc	6360
aaccctatct cgggtctattc ttttgattta taagggattt tggggatttc ggcctattgg	6420
ttaaaaaatg agctgattta acaaaaattt aacgcgaatt aattctgtgg aatgtgtgtc	6480
agttaggggtg tggaaagtcc ccaggctccc cagcaggcag aagtatgcaa agcatgcatc	6540
tcaattagtc agcaaccagg tgtggaaaagt ccccaggctc cccagcaggc agaagtatgc	6600
aaagcatgca tctcaattag tcagcaacca tagtcccgcc cctaactccg cccatcccgc	6660
ccctaactcc gccagttcc gccatttctc cgccccatgg ctgactaatt ttttttattt	6720
atgcagaggc cgaggccgcc tctgcctctg agctattcca gaagtagtga ggaggctttt	6780
ttggaggcct aggcttttgc aaaaagctcc cgggagcttg tatatccatt ttcggatctg	6840
atcagcacgt gttgacaatt aatcatcggc atagtatatc ggcatagtat aatacgacaa	6900
ggtaggaac taaaccatgg ccaagttgac cagtgccgtt ccggtgctca ccgcgcgcga	6960
cgtcgccgga gcggtcgagt tctggaccga ccggctcggg ttctcccggg acttcgtgga	7020
ggacgacttc gccggtgtgg tccgggacga cgtgaccctg ttcacagcg cggtcagga	7080
ccagggtggtg ccggacaaca ccctggcctg ggtgtgggtg cgcggcctgg acgagctgta	7140
cgccgagtgg tcggagggtcg tgtccacgaa cttccgggac gcctccgggc cggccatgac	7200
cgagatcggc gagcagccgt gggggcgggg gttcgccctg cgcgacccgg ccggcaactg	7260
cgtgcacttc gtggccgagg agcaggactg acacgtgcta cgagatttcg attccaccgc	7320
cgccttctat gaaagggttg gcttcggaat cgttttccgg gacgccggct ggatgatcct	7380
ccagcgcggg gatctcatgc tggagttctt cgcccacccc aacttgttta ttgcagctta	7440
taatggttac aaataaagca atagcatcac aaatttcaca aataaagcat ttttttact	7500
gcatttctagt tgtggtttgt ccaaactcat caatgtatct tatcatgtct gtataccgtc	7560
gacctctagc tagagcttgg cgtaatcatg gtcatagctg tttcctgtgt gaaattgtta	7620
tccgctcaca attccacaca acatacgagc cggaagcata aagtgtaaag cctgggggtgc	7680
ctaagtagtg agctaactca cattaattgc gttgcgctca ctgcccgtt tccagtcggg	7740
aaacctgtcg tgccagctgc attaatgaat cggccaacgc gcggggagag gcggtttgcg	7800
tattgggcgc tcttccgctt cctcgtcac tgactcgctg cgctcggtcg ttcggctgcg	7860
gcgagcggta tcagctcact caaaggcggg aatacggtta tccacagaat caggggataa	7920
cgcaggaaaag aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc	7980
gttgctggcg tttttccata gggtccgccc ccctgacgag catcacaaaa atcgacgtc	8040
aagtcagagg tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac caggcgtttc cccctggaag	8100
ctccctcgtg cgctctcctg ttccgaccct gccgcttacc ggatacctgt ccgcctttct	8160
cccttcggga agcgtggcgc tttctcaatg ctcacgctgt aggtatctca gttcgggtgta	8220
ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc gttcagccc accgctgcgc	8280
cttatccggg aactatcgtc ttgagtccaa cccggtaaga cagacttat cgccactggc	8340

# ES 2 620 702 A1

```

agcagccact ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta cagagttctt 8400
gaagtgggtgg cctaactacg gctacactag aaggacagta tttggatatct gcgctctgct 8460
gaagccagtt accttcggaa aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc 8520
tggtagcggg ggtttttttg tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca 8580
agaagatcct ttgatctttt ctacgggggc tgacgctcag tggaacgaaa actcacgtta 8640
agggattttg gtcattgagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa 8700
atgaagtttt aaatcaatct aaagtatata tgagtaaact tggctctgaca gttaccaatg 8760
cttaatcagt gaggcaccta tctcagcgat ctgtctattt cgttcatcca tagttgcctg 8820
actccccgtc gtgtagataa ctacgatacg ggagggcctta ccatctggcc ccagtgtgctc 8880
aatgataccg cgagaccac gctcaccggc tccagattta tcagcaataa accagccagc 8940
cggaagggcc gagcgcagaa gtggtcctgc aactttatcc gcctccatcc agtctattaa 9000
ttgttgccgg gaagctagag taagtagttc gccagttaat agtttgcgca acgttggtgc 9060
cattgctaca ggcacgtgg tgtcacgctc gtcgtttggg atggcttcat tcagctccgg 9120
ttccaacga tcaaggcgag ttacatgatc cccatgttg tgcaaaaaag cggtttagctc 9180
cttcggtcct ccgatcggtg tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac tcatggttat 9240
ggcagcactg cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg 9300
tgagtactca accaagtcatt tctgagaata gtgtatgcgg cgaccgagtt gctcttgccc 9360
ggcgtcaata cgggataata ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg 9420
aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctgttgagat ccagttcgat 9480
gtaaccact cgtgcacca actgatcttc agcatctttt actttcacca gcgtttctgg 9540
gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataaggcgca cacggaaatg 9600
ttgaatactc atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct 9660
catgagcggg tacatatgtg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac 9720
atttccccga aaagtgccac ctgacgctc 9748

```

<210> 5  
 <211> 660  
 <212> PRT  
 <213> mus musculus

<220>  
 <223> hproMMP2

<400> 5

Met Glu Ala Leu Met Ala Arg Gly Ala Leu Thr Gly Pro Leu Arg Ala  
 1 5 10 15

Leu Cys Leu Leu Gly Cys Leu Leu Ser His Ala Ala Ala Ala Pro Ser  
 20 25 30



# ES 2 620 702 A1

Pro Ile Ile Lys Phe Pro Gly Asp Val Ala Pro Lys Thr Asp Lys Glu  
35 40 45

Leu Ala Val Gln Tyr Leu Asn Thr Phe Tyr Gly Cys Pro Lys Glu Ser  
50 55 60

Cys Asn Leu Phe Val Leu Lys Asp Thr Leu Lys Lys Met Gln Lys Phe  
65 70 75 80

Phe Gly Leu Pro Gln Thr Gly Asp Leu Asp Gln Asn Thr Ile Glu Thr  
85 90 95

Met Arg Lys Pro Arg Cys Gly Asn Pro Asp Val Ala Asn Tyr Asn Phe  
100 105 110

Phe Pro Arg Lys Pro Lys Trp Asp Lys Asn Gln Ile Thr Tyr Arg Ile  
115 120 125

Ile Gly Tyr Thr Pro Asp Leu Asp Pro Glu Thr Val Asp Asp Ala Phe  
130 135 140

Ala Arg Ala Phe Gln Val Trp Ser Asp Val Thr Pro Leu Arg Phe Ser  
145 150 155 160

Arg Ile His Asp Gly Glu Ala Asp Ile Met Ile Asn Phe Gly Arg Trp  
165 170 175

Glu His Gly Asp Gly Tyr Pro Phe Asp Gly Lys Asp Gly Leu Leu Ala  
180 185 190

His Ala Phe Ala Pro Gly Thr Gly Val Gly Gly Asp Ser His Phe Asp  
195 200 205

Asp Asp Glu Leu Trp Thr Leu Gly Glu Gly Gln Val Val Arg Val Lys  
210 215 220

Tyr Gly Asn Ala Asp Gly Glu Tyr Cys Lys Phe Pro Phe Leu Phe Asn  
225 230 235 240

Gly Lys Glu Tyr Asn Ser Cys Thr Asp Thr Gly Arg Ser Asp Gly Phe  
245 250 255

Leu Trp Cys Ser Thr Thr Tyr Asn Phe Glu Lys Asp Gly Lys Tyr Gly  
260 265 270

Phe Cys Pro His Glu Ala Leu Phe Thr Met Gly Gly Asn Ala Glu Gly  
275 280 285

Gln Pro Cys Lys Phe Pro Phe Arg Phe Gln Gly Thr Ser Tyr Asp Ser  
290 295 300



# ES 2 620 702 A1

Cys Thr Thr Glu Gly Arg Thr Asp Gly Tyr Arg Trp Cys Gly Thr Thr  
305 310 315 320

Glu Asp Tyr Asp Arg Asp Lys Lys Tyr Gly Phe Cys Pro Glu Thr Ala  
325 330 335

Met Ser Thr Val Gly Gly Asn Ser Glu Gly Ala Pro Cys Val Phe Pro  
340 345 350

Phe Thr Phe Leu Gly Asn Lys Tyr Glu Ser Cys Thr Ser Ala Gly Arg  
355 360 365

Ser Asp Gly Lys Met Trp Cys Ala Thr Thr Ala Asn Tyr Asp Asp Asp  
370 375 380

Arg Lys Trp Gly Phe Cys Pro Asp Gln Gly Tyr Ser Leu Phe Leu Val  
385 390 395 400

Ala Ala His Glu Phe Gly His Ala Met Gly Leu Glu His Ser Gln Asp  
405 410 415

Pro Gly Ala Leu Met Ala Pro Ile Tyr Thr Tyr Thr Lys Asn Phe Arg  
420 425 430

Leu Ser Gln Asp Asp Ile Lys Gly Ile Gln Glu Leu Tyr Gly Ala Ser  
435 440 445

Pro Asp Ile Asp Leu Gly Thr Gly Pro Thr Pro Thr Leu Gly Pro Val  
450 455 460

Thr Pro Glu Ile Cys Lys Gln Asp Ile Val Phe Asp Gly Ile Ala Gln  
465 470 475 480

Ile Arg Gly Glu Ile Phe Phe Phe Lys Asp Arg Phe Ile Trp Arg Thr  
485 490 495

Val Thr Pro Arg Asp Lys Pro Met Gly Pro Leu Leu Val Ala Thr Phe  
500 505 510

Trp Pro Glu Leu Pro Glu Lys Ile Asp Ala Val Tyr Glu Ala Pro Gln  
515 520 525

Glu Glu Lys Ala Val Phe Phe Ala Gly Asn Glu Tyr Trp Ile Tyr Ser  
530 535 540

Ala Ser Thr Leu Glu Arg Gly Tyr Pro Lys Pro Leu Thr Ser Leu Gly  
545 550 555 560

Leu Pro Pro Asp Val Gln Arg Val Asp Ala Ala Phe Asn Trp Ser Lys  
565 570 575

# ES 2 620 702 A1

Asn Lys Lys Thr Tyr Ile Phe Ala Gly Asp Lys Phe Trp Arg Tyr Asn  
580 585 590

Glu Val Lys Lys Lys Met Asp Pro Gly Phe Pro Lys Leu Ile Ala Asp  
595 600 605

Ala Trp Asn Ala Ile Pro Asp Asn Leu Asp Ala Val Val Asp Leu Gln  
610 615 620

Gly Gly Gly His Ser Tyr Phe Phe Lys Gly Ala Tyr Tyr Leu Lys Leu  
625 630 635 640

Glu Asn Gln Ser Leu Lys Ser Val Lys Phe Gly Ser Ile Lys Ser Asp  
645 650 655

Trp Leu Gly Cys  
660



- ②① N.º solicitud: 201700440  
②② Fecha de presentación de la solicitud: 29.03.2017  
③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N15/63** (2006.01)  
**C12N15/79** (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	EP 3081081 A1 (UNIV MIE) 19/10/2016, Figuras 1, 2; reivindicaciones.	1-10
A	WO 0190326 A2 (UPJOHN CO et al.) 29/11/2001, Ejemplo 6.	1-10
A	WO 9621416 A2 (VIAGENE INC) 18/07/1996, Reivindicaciones 1, 2, 13, 14	1-10

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
19.06.2017

Examinador  
J. Manso Tomico

Página  
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, EMBASE, BIOSIS, SEQUENCE SEARCH, INTERNET.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 19.06.2017

**Declaración****Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)**

Reivindicaciones 1-10  
Reivindicaciones

SI  
NO

**Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)**

Reivindicaciones 1-10  
Reivindicaciones

SI  
NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	EP 3081081 A1 (UNIV MIE)	19.10.2016
D02	WO 0190326 A2 (UPJOHN CO et al.)	29.11.2001
D03	WO 9621416 A2 (VIAGENE INC)	18.07.1996

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

D01 divulga (fig. 1) la construcción de un vector de expresión pBS-CAG-hMMP2 para la expresión hMMP2, subclonando un fragmento de cDNA de hMMP2 en un vector pBS-CAG-DESTZ. Esta construcción génica viene caracterizada por la inclusión de un promotor para inducir la expresión gen hMMP2 que es el promotor de beta-actina.

D02 muestra un ejemplo de expresión recombinante de la proteína MMP en células huésped eucarióticas. La expresión se realiza en células de mamífero 293 (células de riñón embrionarias primarias humanas transformadas), preparando un plásmido que lleva la secuencia de codificación de MMP, y usando el vector pSecTag2A. También muestra la expresión de MMP en células COS. Para la expresión de la MMP en células COS7, se clonó la secuencia que codifica la MMP en el vector p3-CI. Este vector es un plásmido derivado de pUC18 que contiene el promotor-intrón de HCMV (citomegalovirus humano) situado aguas arriba de la secuencia de poliadenilación de la hormona bGH (hormona de crecimiento bovina) y un sitio de clonación múltiple.

D03 divulga un método para el tratamiento de tumores sólidos con terapia génica utilizando vectores virales recombinantes que expresan polipéptidos que inician selectivamente la coagulación irreversible de sangre en la vasculatura tumoral, inhiben la neovascularización tumoral, son capaces de activar agentes no tóxicos en agentes tóxicos dentro del tumor que provoca la destrucción del lecho vascular y absorbe o metaboliza nutrientes en la sangre que se suministra al tumor.

Ninguno de los documentos del estado de la técnica divulga una construcción génica, ni un método para la obtención de esa construcción, como la que se divulga en las reivindicaciones 1-10, por lo que el objeto de la invención contenido en las mismas cumpliría con el requisito de novedad, tal y como se menciona en el art. 6 de la ley 11/1986.

El solicitante declara que la construcción y composición farmacológica objeto de la invención permite desarrollar composiciones que controlan la expresión de MMP2, de tal forma que se activa en la célula sólo en caso de necesidad, cuando ésta detecta el inicio del remodelado patológico, y que consta de dos procesos de hipertrofia y fibrosis. La composición objeto de la invención que degrada la fibrosis comienza a actuar sólo en el caso de que el proceso de hipertrofia se inicie. Además, esta composición se activa solo en corazones no sanos.

A la luz de los documentos del estado de la técnica, el experto en la materia no podría derivar de manera obvia una composición génica similar a la reivindicada, con los mismos efectos terapéuticos, por lo que las reivindicaciones 1-10 cumplirían con el requisito de actividad inventiva, tal y como se menciona en el art. 8 de la ley 11/1986.